

A New Enzyme Involved in Microbial Degradation of Curcumin

著者	アザム ハサニナサブ
内容記述	筑波大学博士(生物工学)博士論文・平成23年4月30日授与(甲第5878号)
発行年	2011
その他のタイトル	クルクミンの微生物分解に関わる新規酵素
URL	http://hdl.handle.net/2241/00140044

氏 名 (本籍)	アザム ハサニナサブ (イ ラ ン)
学 位 の 種 類	博 士 (生物工学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5878 号
学位授与年月日	平成 23 年 4 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	A New Enzyme Involved in Microbial Degradation of Curcumin (クルクミンの微生物分解に関わる新規酵素)

主	査	筑波大学教授	農学博士	小 林 達 彦
副	査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副	査	筑波大学准教授	博士 (農学)	高 谷 直 樹
副	査	筑波大学准教授	博士 (農学)	中 村 顕

論 文 の 内 容 の 要 旨

植物由来ポリフェノール的一种であるクルクミノイドに分類されるクルクミンは、カレーのスパイスであるウコンの黄色色素である。古来より食用として用いられ、近年、その生理作用と医学的有用性が盛んに研究されている。クルクミンの生理作用として、抗酸化作用や抗腫瘍作用、抗炎症作用、抗アミロイド作用などが知られている。クルクミンを代謝する微生物の報告はないことから、まずクルクミン代謝微生物のスクリーニングを行った。

ヒトの腸内微生物を対象に解析した結果、種々の腸内微生物がクルクミンを分解することが判明した。特に高いクルクミン分解活性を示した微生物を取得解析した結果、大腸菌であることが判明した。そこで、既に全ゲノムが決定されている大腸菌 K-12 substr.DH10B 株のクルクミン分解活性を測定した結果、スクリーニングで取得した大腸菌よりも高いクルクミン分解活性を示したことから、その後の研究アプローチを鑑み、全ゲノムが決定している大腸菌 K-12 substr.DH10B 株を以下の実験に使用することに決定した。

本大腸菌 DH10B 株を種々の条件下で培養し、高いクルクミン分解活性を与える培養条件を確立した。本最適培養条件で大量培養した菌体を破碎し調製した無細胞抽出液を透析すると活性が低下した。そこで種々のコファクターや金属類を酵素に添加し活性測定を行ったところ、NADPH を添加した場合、活性が飛躍的に上昇することを発見した。従って、以後の実験の反応液中には NADPH を添加することにした。無細胞抽出液を各種クロマトグラフィーに供することにより、SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動上、単一バンドになるまで精製 (収率 1.44%、1100 倍) することに成功した。DH10B は全ゲノムが決定していることから、本精製酵素標品を peptide mass fingerprinting 解析した結果、本酵素をコードする遺伝子の同定に成功し、本酵素は MDR (Medium-chain dehydrogenases/reductases) スーパーファミリーに属することが判明した。本酵素は特徴的な UV-vis スペクトルを示さず、また、金属分析の結果、金属は含んでいないことが判明した。本酵素の至適温度は 35 度、至適 pH は 5.9 で、また、10-50 度、pH4.5-12 において安定であった。本酵素のサブユニット分子量は 38kDa、ネイティブ分子量は 82kDa であったことから、ホモダイマー構造を有していることが示唆された。本酵素の基質特異性を検討した結果、クルクミンに良好に作用することが判明した。

さらに、本反応産物を LC-ESI-MS 等で解析した結果、DHC (dihydrocurcumin) と THC (tetrahydrocurcumin) であることが判明し、反応のタイムコースを解析することによって、クルクミン→DHC→THC のように本酵素は 2 ステップの反応を触媒することが判明した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

クルクミンは抗酸化作用や抗腫瘍作用、抗炎症作用、抗アミロイド作用といった医学的有用性を持ち、食用として広く国民に受け入れられている化合物である。しかしながら、クルクミンの微生物分解・酵素的分解はこれまで未解明の領域であり、ましてや代謝酵素および遺伝子の単離は全くなされていなかった。本研究によって初めて、クルクミンを代謝する微生物が発見されるとともに、クルクミン代謝を担う酵素および遺伝子が初めて同定された。

また、種々の生理作用を示すクルクミンが体内において如何に効いているかは未解明であり、クルクミン類縁化合物やクルクミン代謝（中間）産物においてはなおさらである状況の中、クルクミン類縁化合物や代謝産物もまた様々な生理活性作用を示すことが強く期待されるが、これら化合物自身を合成・調製することは現在、困難な状況にある。本研究で単離され、かつ大量調製が可能になったクルクミン代謝酵素によって、DHC (dihydrocurcumin) や THC (tetrahydrocurcumin) を生産し得る方法が初めて確立された。これら一連の知見は、生命科学研究にインパクトを与えるのみならず、酵素反応によって有用物質を生産する上で重要な成果である。

以上のように、本研究の成果は、分子生物学領域のみならず応用微生物学領域においても大きく貢献するものと判定される。

また、平成 23 年 3 月 5 日、審査専門委員全員の出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。